

ラマン分光・イメージング技術を駆使した未病状態の検出と疾患予測システムへの応用

申請代表者	大嶋 佑介	富山大学学術研究部 工学系	准教授
所外共同研究者	朝岡 竜士	富山大学大学院 理工学教育部	大学院生
所外共同研究者	松本 悠希	富山大学大学院 理工学教育部	大学院生
研究統括者	小泉 桂一	研究開発部門未病分野	教授

■背景・目的

我が国において、リウマチや変形性関節症に代表される軟骨変性疾患、加齢や生活習慣と関連が深い骨粗鬆症、サルコペニア、脊柱管狭窄症、腰痛などの運動器慢性疼痛といった、日常生活に支障をきたすロコモティブシンドロームは現在その予備軍も含め 4,700 万人が相当すると推定されている。また、日本人の死因の第一位である「悪性新生物」、いわゆる大腸がんや白血病などがその代表であり、死因のおよそ3割を占めている。このような社会的背景を踏まえ、研究代表者らは、これまでにラマン分光・非線形光学イメージング技術を駆使して、がん、脊髄損傷、変形性関節症、神経障害性疼痛、骨粗鬆症などの疾患モデル動物を利用した超早期診断法の研究開発を展開してきた。しかしながら、これまでに疾患超早期すなわち未病における疾患マーカーの同定には至っておらず、ラマンスペクトルから得られる生体情報には多くのノイズが含まれるため、従来の解析アプローチでは抽出できる情報に限界があった。本共同研究では、軟骨変性や骨粗鬆症、がん、白血病や炎症状態に伴う細胞変化などに関して、ラマン分光・イメージングにより、生体情報の「ゆらぎ」を「時間軸」の視点から理解することで各種疾病の未病状態や遷移状態を検出し、これらの状態の生物学的な意義を解明すること、および、未病を改善・治癒することが可能な健康・医療戦略を構築することを目的とする（図1）。

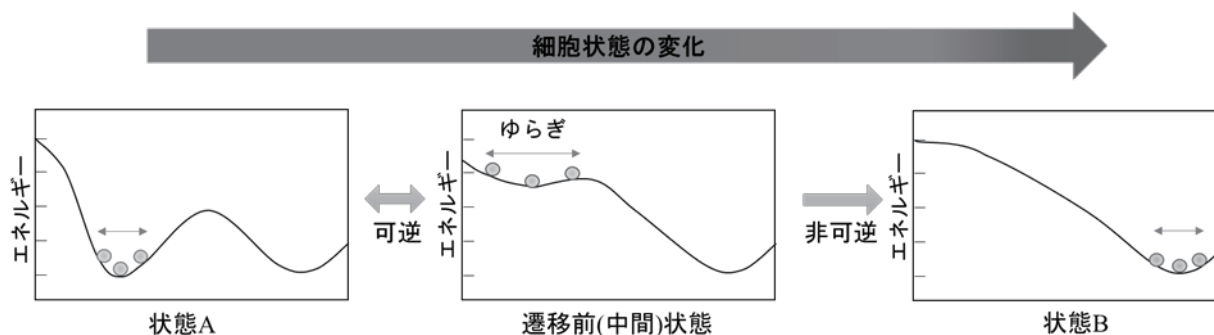


図1 細胞の状態遷移における中間状態と生体情報のゆらぎの関係

種目 (特定研究)

1. 動的ネットワークバイオマーカー (DNB) 理論は、数学の一領域である力学系理論をもとに、動的なバイオマーカーを観測することで、状態の「ゆらぎ」を数値的に解析することができる。研究総括者の小泉らは、DNB 理論を導入し、メタボリックシンドローム自然発症マウスの遺伝子発現量を解析することで、疾患が生じる前のゆらぎが発生する未病状態を数理的に証明することに成功した (K. Koizumi, M. Oku, S. Hayashi, A. Inujima, N. Shibahara, L. Chen, Y. Igarashi, K. Tobe, S. Saito, M. Kadowaki, K. Aihara, Sci. Rep. 9, 8767 2019)。以上の背景を踏まえ、DNB 理論を細胞の早期変化検出に適応できると考え、小泉らは、細胞を炎症誘導した時点から連続的に観察し、ゆらぎの検出から状態遷移点を特定することを考案した。遷移点観察には非破壊かつ連続的に状態変化を測定できる方法が必要であり、固定や染色なく低侵襲的に物質の評価が可能なラマン分光法に着目した。本研究では、ラマン分光法と DNB 理論の組み合わせにより、細胞の炎症誘導過程におけるゆらぎの検出を行った (図2)。

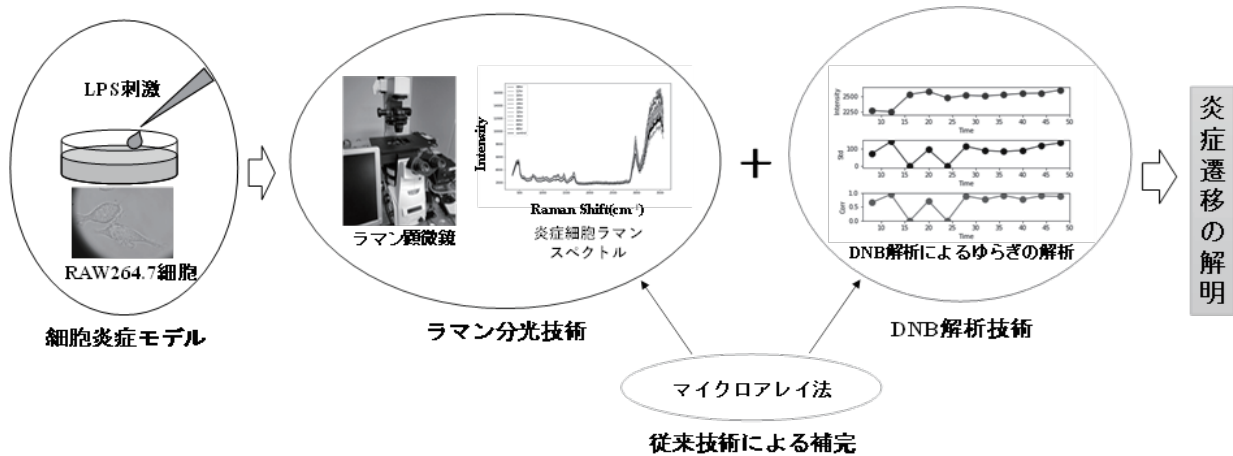


図2 炎症誘導した細胞の連続観察およびDNB解析によるゆらぎの検出

2. 疾患予測システムの実用化による未病状態の検出に先立ち、生体組織のラマン分光計測において疾患状態を的確に把握するため、変形性関節症例の手術検体のラマン分光法による解析を行った。試料調製およびラマンスペクトル測定は、朝岡竜士が担当した。ラマンスペクトル解析によって、変性軟骨の分子組成を明らかにし、正常な状態と疾患の状態を明確に区別することを目的とした。共焦点ラマン顕微鏡 (励起波長 532nm) を用いて、腱板断裂性変形性肩関節症の患者から摘出された手術標本の上腕骨頭のラマンスペクトル解析を行った。クライオスタットを用いて、上腕骨頭の軟骨部分を厚さ 25 μm 程度に薄切し、ラマンスペクトルを取得した (図3)。各検体から得られたスペクトルデータに対して、ベースライン補正等のスペクトル前処理を行ったのち、主成分分析 (PCA) によるラマンスペクトルの特徴抽出を行った。

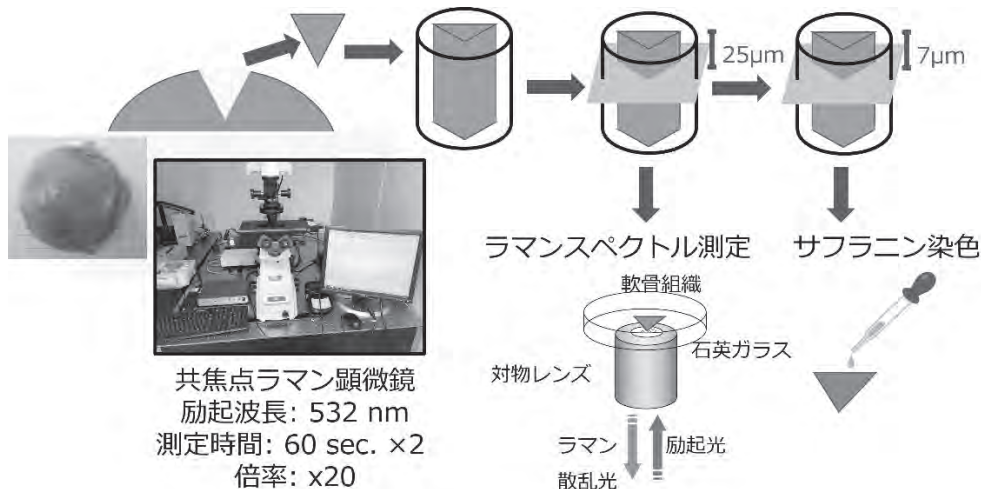


図3 軟骨変性疾患の病態予測のためのラマンスペクトル解析

■結果・考察

培養細胞の経時的・網羅的なラマン分光分析を可能にする顕微ラマンシステムを和漢研未病分野未病創薬ユニット実験室に設置した。顕微鏡 (ECLIPSE Ti : Nikon) は電動ステージを搭載しており、60 倍油浸対物レンズ (Apo TIRF : Nikon) で細胞を観察した。励起光源としてダイオードレーザー (Cobolt Samba 150 532nm) を使用し、サンプルポイントにおいてレーザー強度を 0.2~20mW で調整可能である。分光検出器は冷却 CCD カメラ (BI-DD Cooled CCD, Andor) を用いており、高感度なラマンシグナル検出が可能になっている。本システムは底面が石英の細胞培養ディッシュを置くことで接着細胞を生きたまま計測が可能となっている。細胞の炎症状態を想定し、RAW264.7 (Mouse macrophage cells) を用いて、リポポリサッカライド (LPS) を作用後に経時的に培養細胞のラマンスペクトル測定を行い、細胞の状態遷移とラマンスペクトル変化の相関解析を行った。マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7) に LPS 添加で炎症を誘導し、4 時間ごとに 48 時間まで細胞からラマンスペクトルを取得した。LPS 添加前 1 時間にラマンスペクトルを測定し、これをコントロール群として実験群と比較した。細胞ラマンスペクトルの測定データに対して DNB 理論を基に、「標準偏差および相関強度が急激に上昇する」グループを抽出したものを「DNB」として定義し解析を行い、DNB が大きく変化した時間を追跡した。比較として未添加群を用意し計測と解析を行った。その結果、LPS 投与群において、LPS 添加後 12 時間時点でゆらぎとみなせる DNB の急激な上昇がみられ、LPS 刺激による細胞内変化を本技術で観測できたことが示唆された。DNB 理論を用いて検出されたゆらぎはラマンスペクトルの強度変化のみで捉えることは困難であり、細胞早期変化を捉える新たな指標としてラマン分光法と DNB 理論の組み合わせが有効であると考えられる。

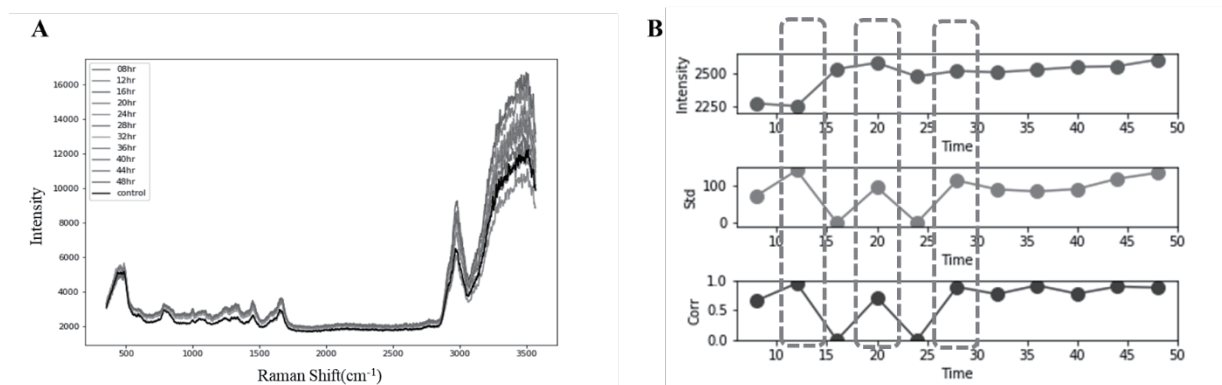


図4 細胞の48時間計測ラマンパクトル(A)とDNB解析結果(B)

ラマン分光法と DNB 解析を組み合わせた技術によって細胞の炎症状態が周期的に変化を生じていることが確認された。本実験中、添加した LPS は除去していないため細胞は継続的に LPS 刺激を受けており、細胞は LPS 刺激を受けて炎症を起こす反応と細胞に生じた炎症を治癒しようとする反応が同時に生じている中間遷移状態を介し、最終的に炎症を起こした安定状態に遷移していくことが推測される。図 4B の DNB 解析の結果は、炎症反応と治癒反応によって細胞が正常状態と中間遷移状態に前後している状態を DNB として検出されている可能性がある。30 時間以降は標準偏差と相関強度が高い状態で安定していることから、細胞の炎症反応と炎症を回避する反応が拮抗し、多くの細胞が中間遷移状態に移行したのではないかと推測される。DNB 解析によって炎症状態に遷移する中間状態の分岐点を探索できる可能性が示唆された。一方で、課題も残されている。今回 DNB 解析に使用したラマンスペクトルは解析への影響を懸念してバックグラウンドノイズの除去を行っていない。現在必要な情報を残したまま DNB 解析に最適なバックグラウンドノイズ除去手法を検討しており、DNB 解析の精度向上および再現性の検証を行っている。今後は、細胞の炎症状態が生じた時間に対しマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現を網羅的に解析し、ラマン分光法と DNB 解析で抽出された変化と比較し詳細な解析を行う予定である。

種目（特定研究）

本技術の臨床応用・社会実装に向けた取り組みとして、同じく共焦点ラマン顕微鏡（励起波長 532 nm）を用いて、腱板断裂性変形性肩関節症の患者から摘出された手術標本 10 検体の上腕骨頭のラマンスペクトル解析を行い、病理組織標本との比較を行った。上腕骨頭の軟骨部分を厚さ 25 μm に薄切し、測定条件 60 秒 \times 2 回積算でラマンスペクトル計測した。また、各検体から得られたスペクトルデータに対して、近似曲線でバックグラウンド補正をし、主成分分析（PCA）を行った。続いて、連続切片を厚さ 7 μm で作成し、サフランin 0 染色を行い、病理組織標本を作成した。10 検体のラマンスペクトルで PCA を行った結果、第二主成分、第三主成分において検体間の差が顕著に見いだされた。図 5 に示すように主成分分析によって大きく 2 つのグループに分けて、それぞれの検体の病理組織標本を比較したところ、おもに染色性の低下、軟骨表面部分の粗造化（表面が粗くなっている）、そして軟骨基質部分の空隙の数・大きさなど形態学的な差を認めた。さらに、第二主成分の負荷量グラフから、軟骨基質の分子組成に差があることを見いだした（図 5）。

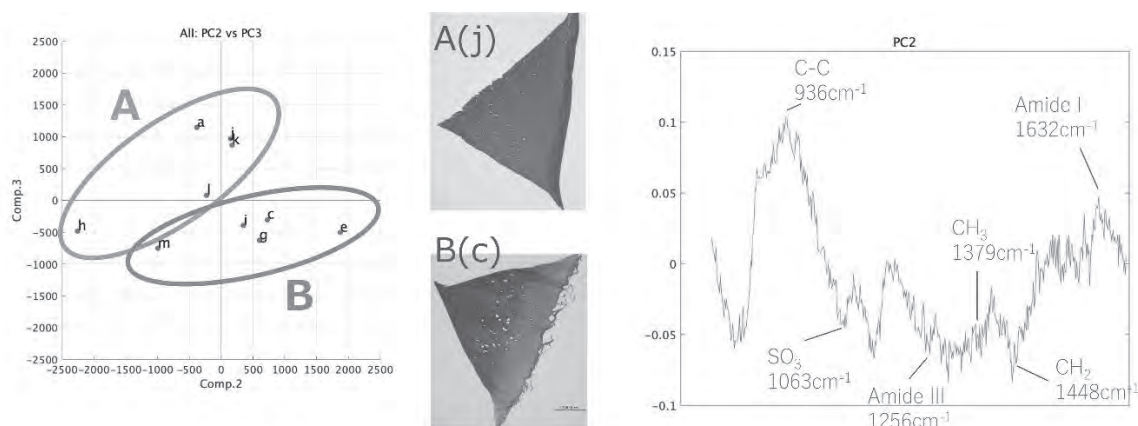


図 5 10 検体のラマンスペクトルデータ主成分分析（PCA）、代表的な病理組織像および主成分負荷量

■結論

ラマン分光・イメージング技術による高い時空間分解能で生細胞の状態遷移を計測する技術と、生体分子の「ゆらぎ」に着目した数学的アプローチを組み合わせることにより、発生ダイナミクス解析や疾患モデルの病態解明を進めることで、未病状態における生物学的ゆらぎの解析、多臓器間ネットワークの解明につながることを期待される。例えば、未病の治療法確立を目指した具体的な展開として、ロコモティブシンドロームのひとつである骨粗鬆症の発症予防、骨折リスク回避への応用が期待される。個体の *in vivo* ラマンスペクトル測定によって、骨質低下やがては骨折リスク増大につながる骨基質の変化を分子レベルで解析することで、ラマンスペクトル上で骨粗鬆症の予後因子をラマンスペクトルの「ゆらぎ」に見出すことができれば、骨基質そのものの異常だけでなく、臓器間ネットワークの異常から発病に至る過程において、未病状態を検出し、いち早く治療を開始することができる。また、再生医療分野への応用も期待される。軟骨の変性・再生の過程におけるラマンスペクトル変化から、リウマチや変形性関節症などの軟骨疾患における、軟骨組織の未病状態を明らかにする。軟骨細胞の分化・未分化状態、軟骨基質の成熟過程をリアルタイムで計測し、ラマンスペクトルの解析を行い、軟骨の再生および変性に関与する未病状態をモニタリングしながら、正常組織へと分化誘導することが可能と考えられる。さらに、がん研究への展開として、ヒト大腸がん組織から樹立したオルガノイドを用いて、ラマン分光・ラマンイメージングのタイムラプス計測を行うことで、状態遷移を鋭敏に捉え、がんの転移・浸潤メカニズムにも迫ることができる。がんの悪性度や浸潤能が異なるがん組織に由来する培養細胞およびオルガノイドを網羅的に解析することで、がん細胞の状態遷移を明らかにすることができれば、がんの超早期診断法への応用が期待できる。